

УДК 576.895.121 : 597.5 : 591.132

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МЕМБРАННОГО ПИЩЕВАРЕНИЯ У ЦЕСТОД И ИХ ХОЗЯЕВ — РЫБ

В. В. Кузьмина, Б. И. Куперман

Институт биологии внутренних вод АН СССР, Борок

Установлено наличие фермента инвертазы, прочно связанного с мембранами тегумента цестод, наряду с ферментами (α -амилаза, щелочная фосфатаза), способными адсорбироваться из химуса кишечника хозяина. Динамика десорбции ферментов, участвующих в мембранном пищеварении, с поверхности гельминтов близка таковой у рыб, что предполагает сходство структурно-функциональной организации их пищеварительно-транспортной поверхности. Показано, что ферментативный аппарат цестод адаптирован к составу пищи хозяев. Полученные данные свидетельствуют о параллельной филогенетической диссоциации ферментов цестод и их хозяев — рыб.

Покровные ткани ленточных червей осуществляют ряд физиологических и биологических функций, лежащих в основе сложных взаимоотношений между паразитами и их хозяевами, и обладают многими структурно-функциональными особенностями, которые свидетельствуют об их значительной адаптации к среде обитания. В частности, у цестод в связи с отсутствием кишечника гидролиз и транспорт нутриентов происходит на поверхности тегумента, интерес к структуре и функциям которого чрезвычайно велик (Smith, 1972; Lumsden, 1975).

Для млекопитающих и рыб установлена важная роль мембранного пищеварения в процессах гидролиза нутриентов (Уголев, 1972; Ugolev, Iezuitova, 1982; Кузьмина, 1978, и др.). Для цестод показано наличие пищеварительных ферментов (амилаза, протеаза, щелочная и кислая фосфатаза и др.), активность которых зависит от видовых особенностей объекта и применяемых методических подходов (Taylor, Thomas, 1968; Аркин, Раева, 1971; Давыдов, Косенко, 1972; Давыдов и др., 1973; Дубовская, 1973; Куровская, 1975; Шишова—Касаточкина, Леутская, 1979). Подчеркивается возможность адсорбции на поверхности тегумента цестод ферментов хозяина и участие их в процессах мембранного пищеварения. В связи с этим большой интерес представляет сравнительное изучение характеристик ферментов, осуществляющих мембранное пищеварение у рыб и их паразитов — ленточных червей.

Цель работы состояла в сопоставлении активности некоторых щеточно-каемных ферментов (щелочной фосфатазы, α -амилазы, инвертазы и суммы карбогидраз), функционирующих в слизистой кишечника рыб и в теле паразитирующих в них цестод, а также динамики их десорбции с пищеварительно-транспортной поверхности.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили половозрелые особи цестод *Eubothrium rugosum* из кишечника налима (*Lota lota*) и *Triacnophorus nodulosus* из кишечника щуки (*Esox lucius*), а также слизистая кишечника налима и щуки Рыбинского водохранилища. Материал собран в зимне-весенний период. Гельминтов и слизистую кишечника исследовали через 2—3 ч после отлова рыб. После извлечения кишечника делали продольный разрез и извлекали гельминтов. Слизистую кишечника промывали охлажденным до 3—5° раствором Рингера для холодно-

кровных животных (рН 7.4), сушили фильтровальной бумагой и снимали специальным скребком. Все операции производили на холоде.

Для изучения особенностей мембранного пищеварения у рыб и гельминтов использовали метод последовательной десорбции α -амилазы с отрезков кишки (Уголев и др., 1969; Кузьмина, 1976) в некоторой модификации, заключающейся в изменении времени экспозиции препаратов и объема десорбата. Исследуемые препараты (несколько особей гельминтов общим весом 500—1000 мг или отрезок среднего отдела кишечника рыб, длиной 2—3 см) помещали в пробирки с 5 мл охлажденного до 3—5° раствора Рингера без глюкозы (рН 7.0—7.5), которые встряхивали в шуттель-аппарате в течение 15 мин. При этом часть ферментов переходила в раствор. Затем препараты последовательно (трижды) переносили в другие пробирки и повторяли описанную выше операцию. После этого слизистую кишечника снимали скребком, взвешивали и гомогенизировали в растворе Рингера. Гельминты гомогенизировались в растворе Рингера целиком. Таким образом получали 5 фракций. Первые 4 из них отражали активность α -амилазы, непрочно фиксированной на поверхности исследуемых препаратов (фракции D_1 , D_2 , D_3 , D_4). При этом фракция D_1 частично содержала фермент, не сорбированный на поверхности препаратов (амилолитическая активность межворсинчатых пространств слизистой кишечника), а прочность фиксации α -амилазы на структурах пищеварительно-транспортной поверхности увеличивалась в ряду D_1 — D_4 . Фракция гомогената (G) в случае слизистой кишечника отражала активность фермента, достаточно прочно фиксированного на микроворсинках энтероцитов, в случае гельминтов — как активность α -амилазы, связанной с покровами тела, так, возможно, и активность ферментов, функционирующих во внутренних органах. Помимо активности α -амилазы в указанных фракциях определяли активность инвертазы и щелочной фосфатазы.

Активность α -амилазы (К.Ф.3.2.1.1) определяли по убыли крахмала модифицированным способом Смита и Роя (Уголев и др., 1969), инвертазы (К.Ф.3.2.1.48) — по приросту гексоз модифицированным методом Нельсона (Уголев, Иезуитова, 1969), щелочной фосфатазы (К.Ф.3.1.3.1) — по приросту п-нитрофенола при гидролизе нитрофенилфосфата натрия. Скорость гидролиза выражали в $\text{мг} \times \text{г}^{-1} \times \text{мин}^{-1}$ (α -амилаза) или $\text{мМ} \times \text{г}^{-1} \times \text{мин}^{-1}$ (инвертаза, щелочная фосфатаза). В качестве субстрата использовали 0.1% растворимого крахмала, 100 мМ раствор сахарозы и 0.6 мМ раствор п-нитрофенилфосфата натрия, приготовленные на растворе Рингера для холоднокровных животных рН 7.4. Инкубацию ферментативного препарата и субстрата осуществляли в течение 10—30 мин при температуре 25° в специальных качалках с термостатирующим устройством. Экспериментальные данные обработаны статистически по методу Стьюдента и Фишера.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Уровни активности ферментов. Данные, представленные на рис. 1, показывают соотношение исследованных ферментов у гельминтов и их хозяев. Сопоставление полученных результатов показывает, что уровень активности карбогидраз, рассчитанный на 1 г массы слизистой кишечника, выше, чем активность 1 г сырой массы гельминтов. При этом видовые различия на уровне соответствующих ферментативных активностей обнаружены и у рыб, и у гельминтов. Так, активность α -амилазы, функционирующей в составе слизистой кишечника налима, почти в 2 раза выше, чем у щуки. Различия в уровне активности α -амилазы гельминтов менее выражены: активность фермента у *Eubothrium rugosum* лишь в 1.3 раза выше, чем у *Triaenophorus nodulosus*. Результаты, полученные при исследовании инвертазы, свидетельствуют о существовании значительных различий не только в уровне активности фермента, функционирующего в составе слизистой кишечника рыб, но и в уровне активности фермента у гельминтов. При этом значения, полученные для слизистой кишечника налима, в 1.7 раза выше таковых у щуки, для *E. rugosum* — почти в 10 раз выше, чем у *T. nodulosus*.

При исследовании щелочной фосфатазы также обнаружены видовые различия, однако их характер противоположен наблюдаемому для карбогидраз.

Действительно, активность щеточнокаемного фермента у щуки в 1.4 раза выше, чем у налима. У гельминтов активность щелочной фосфатазы выше, чем в слизистой кишечника. При этом у *T. nodulosus* активность щелочной фосфатазы в 9.2 раза выше, чем у *E. rugosum*.

Таким образом, у гельминтов, паразитирующих в кишечнике налима и щуки, обнаружена активность α -амилазы, инвертазы и щелочной фосфатазы. При этом уровень активности карбогидраз ниже, а щелочной фосфатазы — выше, чем в слизистой кишечника их хозяев — рыб. Обнаружены также различия в уровне ферментативной активности у гельминтов из кишечника налима и щуки: у *E. rugosum* выше активность карбогидраз, у *T. nodulosus* — щелочной фосфатазы.

Десорбционные характеристики ферментов. Известно, что локализация и прочность фиксации ферментов, обеспечивающих протекание процессов мембранного пищеварения на структурах энтероцитов млекопитающих и рыб, различна (Уголев и др., 1972; Кузьмина, 1976, 1977,

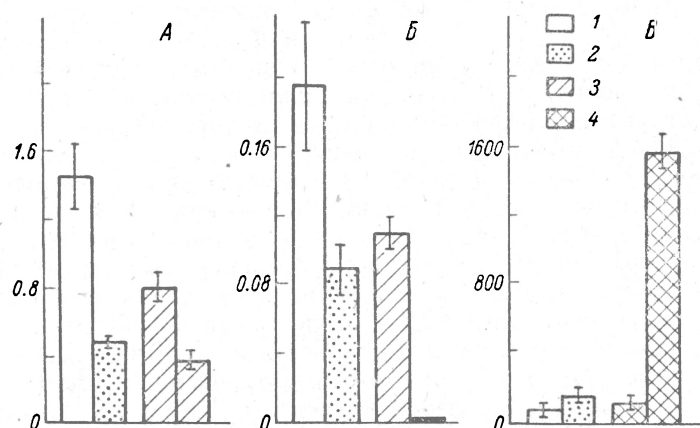


Рис. 1. Соотношение активности α -амилазы (А), инвертазы (Б) и щелочной фосфатазы (В) в слизистой кишечника рыб и паразитирующих в них гельминтах.

1 — налим; 2 — *Eubothrium rugosum*; 3 — щука; 4 — *Triaenophorus nodulosus*. По оси ординат — уровень ферментативной активности (на А — $\text{мг} \times \text{г}^{-1} \times \text{мин}^{-1}$; на Б и В — $\text{мм} \times \text{г}^{-1} \times \text{мин}^{-1}$). Вертикальные линии на столбиках — стандартные ошибки среднего.

1978). Поскольку для гельминтов подобные сведения отсутствуют, мы сопоставили активность α -амилазы, инвертазы и щелочной фосфатазы в различных фракциях, полученных по схеме, приведенной в разделе «Материал и методы». Для сравнения в идентичных условиях исследовали слизистую кишечника рыб.

На рис. 2 приведены данные по кинетике десорбции α -амилазы (I), щелочной фосфатазы (II) и инвертазы (III) для гельминтов (А) и рыб (Б). Результаты, полученные для α -амилазы, свидетельствуют о значительном сходстве десорбционных характеристик всех исследованных препаратов. Особенно это касается данных, полученных для гельминтов. Как у гельминтов из кишечника налима, так и у гельминтов из кишечника щуки наибольшая активность α -амилазы обнаружена в фракции гомогената (Г) — приблизительно 60–70% от суммарной активности препарата. Активность десорбируемого фермента в фракциях D_1 – D_4 последовательно снижается, достигая в фракции D_4 минимальных значений — 2–4%. Также следует отметить высокую активность десорбируемой амилазы у *E. rugosum* (различия для фракций D_1 – D_3 статистически достоверны). Как указывалось, данные, полученные для слизистой кишечника рыб, близки приведенным выше. Однако при исследовании слизистой кишечника щуки, несмотря на одинаковое соотношение фракций D/G (и для гельминтов, и для рыб получено соотношение, близкое 30/70, т. е. приблизительно 0.43), отмечена большая активность в ряду D_1 – D_4 . Для налима получена несколько иная картина: приблизительно половина активности кишечного препарата найдена в фракциях D_1 – D_4 . Данные, полученные для слизистой кишечника рыб, близки обнаруженным ранее в несколько иных условиях эксперимента (Кузьмина, 1976, 1977).

Поскольку кишечная слизистая адсорбирует на своей поверхности панкреатическую α -амилазу, данные по кинетике ее десорбции интерпретируются однозначно в плане прочности фиксации фермента на структурах энтероцита. Данные, полученные при исследовании гельминтов, интерпретировать труднее, так как часть активности фермента в фракциях D_1 — D_4 и особенно гомогената может быть обусловлена активностью фермента, синтезируемого в организме гельминта,

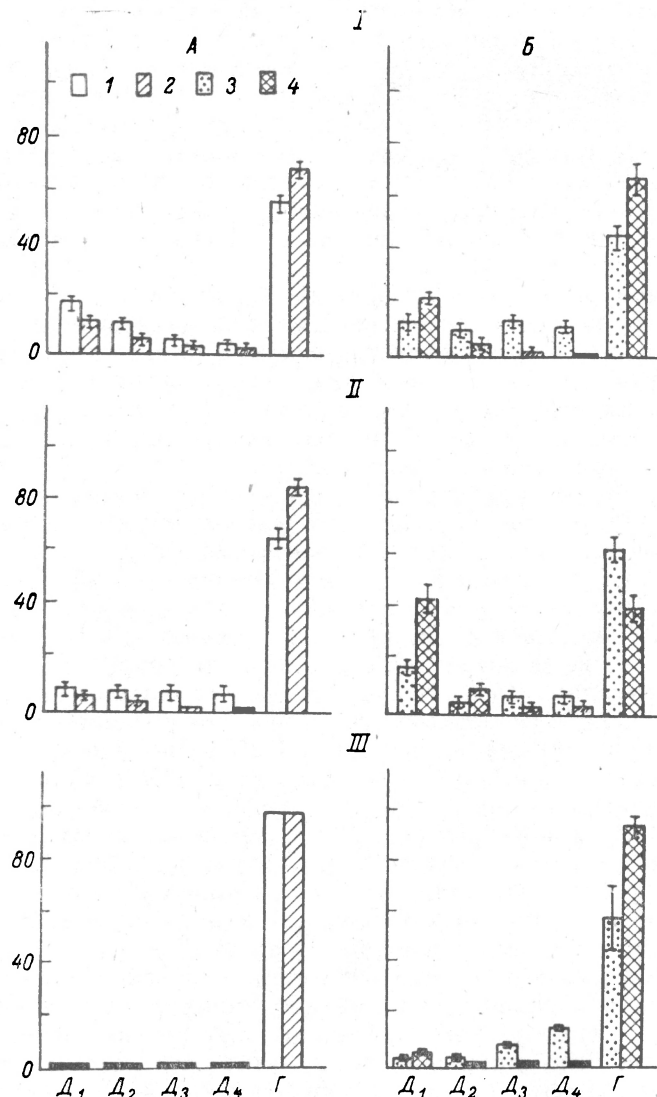


Рис. 2. Соотношение активности α -амилазы (I), щелочной фосфатазы (II) и инвертазы (III) в фракциях, полученных при десорбции ферментов с пищеварительно-транспортных поверхностей гельминтов и рыб.

A* — гельминты, B — рыбы; 1 — *E. rugosum*; 2 — *T. nodulosus*; 3 — налим; 4 — щука. По оси абсцисс — фракции: D_1 — D_4 — активность десорбируемых ферментов, Γ — активность гомогената; по оси ординат — активность ферментов в указанных фракциях (в процентах от суммарной активности препарата, принятой за 100%).

часть — адсорбирована из содержимого кишечника рыб. К сожалению, методические подходы, использованные в настоящей работе, не позволяют ответить на вопрос о том, какова природа этого фермента (собственный или адсорбированный). Не определено также соотношение активности α -амилазы, функционирующей на поверхности тела гельминта, и фермента, функционирующего во внутренних органах. Однако не оставляет сомнения тот факт, что на поверхности тела функционирует как минимум 40—50% от общего количества ферментов. При этом 30—40% от общего количества непрочно связано с покровами

тела гельминтов (фракции D_1 — D_4) и, по-видимому, не менее 10% — прочно (часть фракции G). Возможность такого предположения вызвана тем, что, как показано ранее, у ряда видов рыб на фракцию G приходится 10—20% общей активности α -амилазы (Кузьмина, 1977).

Результаты, касающиеся активности щелочной фосфатазы в указанных выше фракциях, отражают, как правило, ту же закономерность. Наиболее высокая активность фермента отмечена во фракции гомогената у *T. nodulosus*, несколько меньшая в той же фракции — у *E. rugosum*. Активность щелочной фосфатазы в фракциях D_1 — D_4 у *E. rugosum* выше, чем у *T. nodulosus*. Различия в уровне активности отдельных фракций в первом случае статистически недостоверны, во втором — отмечено последовательное, статистически достоверное снижение активности фермента. При исследовании слизистой кишечника налима получены близкие результаты. Максимальная активность фермента из кишечника щуки обнаружена во фракции D_1 . Вследствие этого относительная активность фракции G оказалась наиболее низкой по сравнению с другими препаратами.

Таким образом, материалы, представленные на рис. 1 и 2, свидетельствуют как о более высоком уровне активности щелочной фосфатазы у гельминтов, так и о большой относительной активности фракции G по сравнению с аналогичными характеристиками слизистой кишечника. Однако в настоящее время, также как и в случае α -амилазы, нельзя судить о том, какая часть активности щелочной фосфатазы обусловлена ферментом, локализованным на поверхности тела гельминтов, а какая часть — соматическим.

Наибольший интерес представляют данные по активности инвертазы — типичного щеточнокаемного фермента энтероцитов кишечника млекопитающих и рыб. Этот фермент у позвоночных синтезируется в кишечных клетках, транслируется в зону щеточной каймы и локализуется на мембранах микроворсинок. Инвертаза, будучи структурно связанной с мембранами энтероцитов, не подвергается спонтанной солюбилизации (Уголев, 1972) и может быть использована в качестве маркера при решении ряда вопросов.

Анализ материалов, касающихся активности инвертазы в полученных фракциях (рис. 2, III), свидетельствует о том, что у гельминтов весь фермент находится в фракции гомогената: у щуки — 4.2% в фракции D_1 , а 95.8% в фракции G ; у налима — лишь 64.3% в фракции G , а 36.7% в фракциях D_1 — D_4 . Значительная активность инвертазы в этих фракциях может свидетельствовать не столько о солюбилизации исследованных ферментов, сколько о десквамации энтероцитов, что согласуется с ранее полученными данными (Кузьмина, 1977).

Полученные результаты подтверждают возможность осуществления заключительных этапов гидролиза углеводов на поверхности тела гельминтов и наряду с другими фактами свидетельствуют об участии процессов мембранного пищеварения в усвоении пищи у ленточных червей. Кроме того, они свидетельствуют о значительных видовых различиях в активности инвертазы у *E. rugosum* и *T. nodulosus* (рис. 1). Наконец, данные, полученные при исследовании слизистой кишечника рыб, показывают, что часть клеточного материала в ходе исследования оказалась в фракциях D_1 — D_4 . Следовательно, высокий уровень активности всех исследованных ферментов в этих фракциях в значительной мере обусловлен десквамацией энтероцитов, особенно у налима.

Соотношение уровня ферментативных активностей в различных частях тела *Triaenophorus nodulosus*. При исследовании покровов взрослых *T. nodulosus*, как и многих других цестод, выявлены существенные отличия в ультраструктуре разных участков их стробилы (Куперман, 1980), что отражает разнообразие их функций. Наибольшего развития покровы достигают в зоне роста и формирования гонад, что обеспечивает интенсивную трофическую функцию в той части тела, где происходит активный морфогенез половозрелых червей. Высота тегументального слоя заметно уменьшается в отделах стробилы со сформированными гонадами. В зрелых члениках задней части тела можно наблюдать деструктивные изменения покровов, отражающие нарушение трофической и защитной функций перед отхождением червей из кишечника хозяина (Куперман, 1981). В связи с этим исследуемых особей условно делили на 3 части: 1-я — зона сколекса и шейки,

2-я — зона роста и формирования гонад, 3-я — зона с полностью сформированными гонадами, содержащими зрелые яйца.

Результаты определения активности суммарных карбогидраз, инвертазы, α -амилазы и щелочей фосфатазы представлены на рис. 3. Анализ полученных данных свидетельствует о том, что все части тела гельминта, включая шейку и сколекс, обладают ферментативной активностью (щелочная фосфатаза). Однако наличие градиента активности этого фермента с максимумом в каудальном отделе может быть связано не столько с большой эффективностью пищеварительно-транспортных процессов, сколько с высокой щелочнофосфатазной актив-

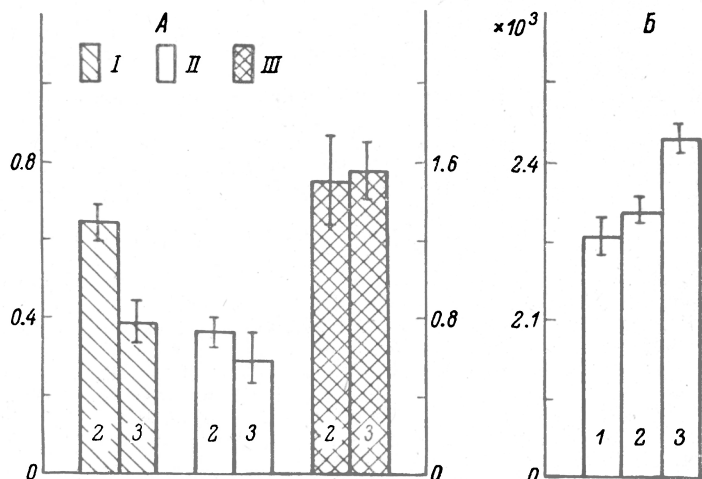


Рис. 3. Уровень ферментативной активности в различных участках стробилы *T. nodulosus*.

А — уровень активности карбогидраз; Б — уровень активности щелочной фосфатазы ($\text{мМ} \times \text{г}^{-1} \times \text{мин}^{-1}$). I — сумма карбогидраз, II — инвертаза, III — α -амилаза (I, II — слева, $\text{мМ} \times \text{г}^{-1} \times \text{мин}^{-1}$; III — шкала справа, $\text{мг} \times \text{г}^{-1} \times \text{мин}^{-1}$); Участки стробилы: 1 — передний, 2 — средний, 3 — задний.

ностью гонад (Давыдов, 1979). Небольшая масса первого участка не позволила провести определение в ней активности карбогидраз. Исследование двух последних участков показало отсутствие достоверных различий в уровне активности α -амилазы и инвертазы, а также достоверно меньшее значение активности суммы карбогидраз в заднем отделе.

Ранее было показано, что тегумент цестод обладает значительной адсорбционной емкостью (Куровская, 1975). Отсутствие достоверных различий в активности α -амилазы в двух последних участках тела *T. nodulosus*, обнаруженное нами, может быть в значительной мере обусловлено их одинаковой адсорбционной способностью. Поскольку активность карбогидраз, помимо α -амилазы и инвертазы, обусловлена активностью различных олиго-, тетра-, три- и дисахаридаз, в том числе мальтазы, полученные результаты могут свидетельствовать о большей роли среднего отдела цестод в гидролизе и транспорте углеводов. К сожалению, в настоящее время нет убедительных данных о наличии и возможной функции отдельных карбогидраз в теле цестод, поэтому нельзя точно рассчитывать их активность, связанную с пищеварительно-транспортными функциями тегумента.

Л и т е р а т у р а

- Аркинд М. В., Раева И. И. Мембранное (пристеночное) пищеварение у цестод. — ЖЭБиФ, 1971, т. 7, № 4, с. 375—379.
- Давыдов В. Г. Гистохимическое изучение псевдофиллидных цестод. — Тр. Ин-та биол. внутр. вод АН СССР, 1979, вып. 38 (41), с. 189—200.
- Давыдов О. Н., Косенко Л. Я. Пристеночное пищеварение у плероцеркоида *Ligula intestinalis*. — Паразитология, 1972, т. 6, № 3, с. 269—273.
- Давыдов О. Н., Куровская Л. Я., Стражник Л. В. Об углеводном питании цестоды *Bothrioccephalus gowkongensis* (Yen, 1955). — Гидробиол. журн. 1973, т. 9, № 6, с. 67—73.
- Дубовская А. Я. Исследование протеолитической активности у некоторых видов цестод. — Паразитология, 1973, т. 7, вып. 2, с. 154—159.

- Кузьмина В. В. Применение метода последовательной десорбции α -амилазы с отрезка кишки при изучении мембранного пищеварения у рыб. — *Вопр. ихтиологии*, 1976, т. 16, вып. 5, с. 944—946.
- Кузьмина В. В. Особенности мембранного пищеварения у пресноводных костистых рыб. — *Вопр. ихтиол.*, 1977, т. 17, вып. 1, с. 111—119.
- Кузьмина В. В. Мембранное пищеварение у круглоротых рыб. — *Вопр. ихтиол.*, 1978, т. 18, вып. 4, с. 684—696.
- Куперман Б. И. Ультраструктура покровов цестод и ее значение для систематики. — *Паразитол. сб. ЗИН АН СССР*, 1980, т. 29, с. 84—95.
- Куперман Б. И. Ультратонкая структура покровных тканей и железистых аппаратов цестод в онтогенезе. — *Информ. бюл. Ин-та биол. внутр. вод АН СССР*, 1981, № 51, с. 29—36.
- Куровская Л. Я. Амилолитическая активность плероцеркоида *Ligula intestinalis*, — паразита карповых рыб. — В кн.: *Некоторые вопросы экологии и морфологии животных*. Киев, 1975, с. 33—34.
- Уголев А. М. Мембранное пищеварение. Полисубстратные процессы, организация и регуляция. Л. Наука, 1972. 356 с.
- Уголев А. М. Определение амилолитической активности. — В кн.: *Исследование пищеварительного аппарата у человека (обзор совр. методов)*. Л., Наука, 1969, с. 187—192.
- Уголев А. М., Иезуитова Н. Н. Определение активности инвертазы и других дисахаридаз. — Там же, с. 192—196.
- Уголев А. М., Иезуитова Н. Н., Масевич С. Г., Надирова Т. Я., Тимофеева Н. М. — Там же, с. 216.
- Шишова-Касаточкина О. А., Леутская З. К. Биохимические аспекты взаимоотношений гельминта и хозяина. М., Наука, 1979. 279 с.
- Lumsden R. D. Surface ultrastructure and cytochemistry of parasitic helminths. — *Exp. Parasitol.*, 1975, vol. 37, N 2, p. 267—339.
- Smith J. D. Changes in the digestive-absorptive surface of cestodes during larval adult differentiation. — *Symp. Brit. Soc. Parasitol.*, 1972, vol. 10, p. 41—70.
- Taylor E. W., Thomas J. N. Membrane (contact) digestion in the three species of tapeworm *Hymenolepis diminuta*, *Hymenolepis microstoma* and *Moniezia expansa*. — *Parasitology*, 1968, vol. 58, N 3, p. 535—546.
- Ugolev A. M., Iezuitova N. N. Membrane digestion and modern concepts of food assimilation. — *Wed. Rev. Nutr. Diet.*, 1982, vol. 40, p. 113—187.

COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF THE MEMBRANE DIGESTION IN CESTODES AND IN THEIR HOSTS, FISHES

V. V. Kuzmina, B. I. Kuperman

SUMMARY

The invertase ferment closely connected with membranes of tegument of cestodes was first found alongside with ferments (α -amylase, alkaline phosphatase) capable of adsorbing from chyme of the host's intestine. The desorption dynamics of ferments participating in the membranous digestion from the surface of helminths is close to that of fishes that suggests a certain similarity in a structural-functional organisation of their digestive-transport surface. Differences were found in the activity rates of summary carbohydrases in various parts of the cestode's strobile. A higher activity of maltases and oligosaccharidases group in the middle part points to its trophic importance that is in good agreement with the data on its ultrastructure. It has been established that the fermentative apparatus of cestodes is adapted to food contents of their hosts. The obtained data show that there is parallel phylogenetic dissociation between the ferments of cestodes and their hosts, fishes.